论著

文章编号:1000-5404(2008)08-0750-04

蛋白酶体抑制剂 MG-132 改善大鼠心肌梗死后心肌结构重塑

陈章荣,罗开良,殷跃辉,胡 蓉,肖 骏 (重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨 MG-132 对大鼠心肌梗死(心梗)后心肌结构重塑的影响及机制。**方法** 制作大鼠心梗模型,分为 MG-132 干预(MG)组和心梗对照(MI)组,另设假手术(SH)组,每组大鼠 16 只。MG 组于术后 24 h 腹腔注射 MG-132 (0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}),MI 组及 SH 组注射生理盐水对照。连续给药 28 d,然后超声检测心脏左室前壁厚度、左室后壁厚度、左室舒张末期直径;处死动物计算左室重量指数及梗死面积,RT-PCR 和 Western blot 分别检测核转录因子-κB p65 (NF-κB p65)及白介素-1β(IL-1β)的 mRNA 和蛋白质表达量。**结果** 梗死面积在 MI 组和 MG 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。与 SH 组比较,MI 组和 MG 组的左室后壁厚度、左室舒张末直径、左室质量指数明显增大,左室前壁厚度明显减少, NF-κBp65 和 IL-1β 的 mRNA 及蛋白质表达量明显增加 ,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与 MI 组比较,MG 组左室后壁厚度、左室舒张末直径、左室质量指数,左室前壁厚度改变明显减轻,NF-κB p65 和 IL-1β 的 mRNA 及蛋白质表达量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** MG-132 能一定程度地改善大鼠心梗后心肌结构重塑,其机制可能与抑制 NF-κB 激活,下调炎性细胞因子如 IL-1β 表达有关。

关键词: 心肌梗死;心肌结构重塑;蛋白酶体抑制剂;NF-κB;IL-1β

中图法分类号: R364.33;R392.3;R542.22 **文献标识码:** A

Proteasome inhibitor MG-132 improves left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats

CHEN Zhang-rong, LUO Kai-liang, YIN Yue-hui, HU Rong, XIAO Jun (Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and possible mechanisms of proteasome inhibitor MG-132 on left ventricular remodeling following acute myocardial infarction in rats. Methods The myocardial infarction model in rats was induced by ligating left anterior descending coronary artery. Thirty-two adult Sprague-Dawley rats that survived 24 h after acute myocardial infarction were randomly divided into myocardial infarction (MI) group and MG-132-treated (MG) group. Sixteen matchable rats were designated as sham-operated group (SH group). Rats in MG group were treated with MG-132 (0.1 mg/kg, i.p. daily) for 28 d, while rats in MI group and SH group were given normal saline as control. On 28th day, the changes of left ventricle structure were measured by echocardiography. The left weight index and infarct size were evaluated. The mRNA and protein levels of NF-κB p65 and IL-1β were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and by Western blot, respectively. Results Compared with SH group, the values of left ventricle posterior wall thickness (LVPWT) and left ventricle end diastolic diameter (LVEDD) were significantly increased in MI group and MG group ($P<0.01$). However, the values of left ventricle anterior wall thickness (LVAWT) were remarkably decreased ($P<0.01$). The values of LVPWT, LVEDD and LVW/BW in MG group were notably decreased than those in MI group ($P<0.01$), whereas the changes of LVAWT in MG group increased ($P<0.01$). Moreover, the mRNA and protein levels of NF-κB p65 and IL-1β in MG group were lower than those in MI group ($P<0.01$). Conclusion Left ventricular remodeling following acute myocardial infarction could be improved by proteasome inhibitor MG-132 through suppressing NF-κB activation and the expression of inflammatory factor such as IL-1β in rats.

Key words: myocardial infraction; myocardial remodeling; proteasome inhibitor; NF-κB; IL-1β

作者简介:陈章荣,男,贵州省兴仁县人,博士,主治医师,主要从事冠心病方面的研究。电话:(023)63693147,E-mail:zhangrongchen71@sina.com

通信作者:罗开良,电话:(023)66737128, E-mail: luoklcq@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-08-30;**修回日期:**2007-11-06

心肌梗死(心梗)后心肌结构重塑是心衰发展的重要基础,改善心肌结构重塑是降低心衰发生率的基本措施之一。引起心梗后心肌结构重塑的机制目前尚不清楚,近年来发现炎性细胞因子的持续表达在心梗后心肌结构重塑中起重要作用[1]。在炎性细胞因子的转录调节中,核转录因子(NF-κB)信号通路的激活发挥了关键作用,而 NF-κB 的激活过程由泛素-蛋白酶体系统调控。因此,泛素-蛋白酶体抑制剂能抑制 NF-κB 的激活,下调炎性细胞因子如 IL-1β 表达,从而减轻炎症反应。戴翠莲等[2,3]证实蛋白酶体抑制剂 MG-132 能抑制 NF-κB 活性,减轻大鼠心肌缺血再灌注的损伤。因此,可以推测 MG-132 对大鼠心梗后心肌结构重塑可能有改善作用,本研究对此进行了探讨,以望为心梗后心肌结构重塑的治疗寻求一种新方法。

1　材料与方法

1.1　动物心梗模型的建立及给药方法

体质量相近的 SD 大鼠(雌雄各半,购于重庆医科大学实验动物中心),体质量(250 ± 50)g。心梗模型制作参照文献[4]进行。胸骨左缘第 2 ~ 4 肋开胸,以左冠脉主干为标志,在左心耳下方 2 mm 处进针,6-0 号丝线结扎左前降支,当结扎区域变白,心电图两个以上的肢导联出现 ST 段上抬≥0.2 mV,则判断为造模成功。将造模成功且术后 24 h 仍存活的大鼠分为 MI 组和 MG 组。另设假手术(SH)组,SH 组在相同冠脉部位只穿线不结扎。每组动物均为 16 只。MG 组于术后 24 h 腹腔内注射 MG-132(Calbiochem 公司,美国)0.1 mg · kg^{-1} · d^{-1}[5],连续给药 28 d,MI 组及 SH 组腹腔内注射生理盐水作为对照。

1.2　计算动物心衰发生率及生存率

心衰的判断标准:精神萎靡、饮食差、活动减少、皮肤松弛、毛色欠光亮、气促,并且尸检发现肝淤血、肺淤血伴或不伴胸腔积液、腹腔积液。

1.3　超声心动图

大鼠在处死前均行超声心动图检查(HP/SONOS 5500 多普勒超声仪,探头频率 4 ~ 10 MHz),测定左室前壁厚度、左室后壁厚度、左室舒张末径。

1.4　计算左室质量指数、梗死面积

处死动物,摘取心脏,剔除血管组织及右心室,称取左心室质量,除以体质量获得左室质量指数(mg/g)。然后沿左心室长轴分为 3 份,取中间部分作常规病理切片,行苦味酸天狼猩红染色,梗死区瘢痕组织染成红色,非梗死区染成黄色,佳能 A530 摄影后用 Image Pro Plus 4.5 软件行图像分析,计算梗死面积[6]。计算公式:梗死面积(%) = (瘢痕内弧长 + 瘢痕外弧长)/(外周长 + 内周长) × 100%。

1.5　半定量 RT-PCR 检测 NF-κB 及 IL-1β mRNA 表达

Trizol 法提取大鼠心肌组织总 RNA。引物由上海博尚生物公司合成,各引物序列见表 1。RT-PCR 反应体系为 50 μl,按试剂盒(Toyobo 公司,日本)说明 2 步完成。

表 1　NF-κB、IL-1β 和 β-actin 的 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列
NF-κB p65(480 bp)	上游 5′-CAGCACATCCAGACAGACACCA-3′
	下游 5′-GCTGCTAAAAGAATCCTCAAAACC-3′
IL-1β(381 bp)	上游 5′-CACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG-3′
	下游 5′-AAGACAAACCGCTTTTCCATC-3′
β-actin(219 bp)	上游 5′-CAGCTTCTTCTAGTGCCGTTCC-3′
	下游 5′-GGAGTCAGGTGTTTCTGGTGGAG-3′

1.6　Western blot 检测 NF-κB、IL-1β 蛋白表达

取大鼠心肌组织,按 RIPA 试剂说明提取心肌总蛋白,BCA-100 测定蛋白含量。取 40 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶封闭 1 h 后分别与兔抗鼠 NF-κB、IL-1β、β-actin 抗体(Santa Cruz 公司产品)(以 TBS 稀释,浓度分别为 1∶750、1∶500、1∶500)室温孵育 2 h;洗膜后与二抗(羊抗兔 IgG)室温孵育 1 h 后化学发光显影,凝胶成像系统拍照、扫描分析。

1.7　统计学分析

所有数据采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,3 组之间比较采用方差分析。率用百分比表示,采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　心衰发生率及生存率

SH 组大鼠无心衰发生,MI 组和 MG 组分别有 10 只和 6 只发生心衰,其发生率分别为 62.5% 和 37.5%。MI 组与 SH 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),而 MG 组与 MI 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。MI 组 1 只大鼠死于脓胸,4 只死于心衰。MG 组 2 只大鼠死于心衰。MI 组、MG 组、SH 组的生存率分分别为 68.7%、87.5%、100%。与 SH 组相比,MI 组的生存率差异有统计学意义($P < 0.05$),而 MG 组与 MI 组的生存率差异无统计学意义($P > 0.05$)。MI 组和 MG 组发生心衰后死亡率分别为 40%、33.3%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2　超声心动图

超声心动图检测结果见表 2。与 SH 组比较,MI 组左室前壁厚度减少,左室后壁厚度和左室舒张末直径显著增加,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。而 MG 组大鼠的上述指标均得到明显改善,提示 MG-132 能改善大鼠心梗后心肌结构重塑。

表 2　超声心动图检查结果($\bar{x} \pm s$, mm)

组别	例数	左室舒张末直径	左室前壁厚度	左室后壁厚度
SH 组	16	5.12 ± 0.40	0.60 ± 0.07	1.25 ± 0.17
MI 组	11	7.52 ± 0.40[a]	0.36 ± 0.06[a]	1.88 ± 0.17[a]
MG 组	14	5.75 ± 0.39[bc]	0.51 ± 0.07[bc]	1.42 ± 0.16[bc]

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.01$, 与 SH 组比较; c: $P < 0.01$, 与 MI 组比较

2.3　左室质量指数、梗死面积

大鼠体质量、左室质量、左室质量指数、梗死面积的检测结果见表 3。3 组大鼠的体质量无统计学差异($P > 0.05$)。SH 组无心肌梗死发生,MG 组和 MI 组的心肌梗死面积相似($P > 0.05$),左室质量和质量指数均显著较 SH 组增大($P < 0.01$),MG 组的增大程度轻,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表3 体质量、左室质量、左室质量指数、梗死面积结果

组别	例数	体质量(g)	左室质量(mg)	左室质量指数(mg/g)	梗死面积(%)
SH 组	16	312.8±8.1	685.3±19.3	2.19±0.04	
MI 组	11	308.1±8.0	1190.7±21.8[a]	3.54±0.05[a]	40.55±3.88
MG 组	14	311.7±7.4	962.0±18.1[ab]	3.08±0.06[a]	40.21±4.11

a: $P<0.01$,与 SH 组比较; b: $P<0.01$,与 MI 组比较

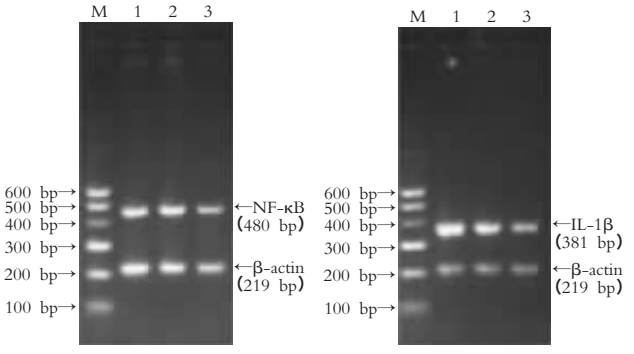
2.4 NF-κB 和 IL-1β 的 mRNA 表达

与 SH 组相比,MI 组和 MG 组 NF-κB 、IL-1β 的 mRNA 表达量明显增加($P<0.01$),与 MI 组相比,MG 组的 mRNA 表达明显降低($P<0.01$,表4)。提示心梗后心脏的 NF-κB 、IL-1β 的 mRNA 表达增加,而 MG-132 能抑制两者的表达(图1)。

表4 NF-κB、IL-1β 的 mRNA 表达量($n=6$)

组别	NF-κB/β-actin	IL-1β/β-actin
SH 组	0.75±0.04	1.66±0.08
MI 组	1.23±0.05[a]	3.03±0.08[a]
MG 组	0.85±0.05[bc]	2.21±0.06[bc]

a: $P<0.01$, b: $P<0.01$,与 SH 组比较; c: $P<0.01$,与 MI 组比较



M:标准;1:MI 组;2:MG 组;3:SH 组

图1 大鼠心肌 NF-κB、IL-1β 的 RT-PCR 结果

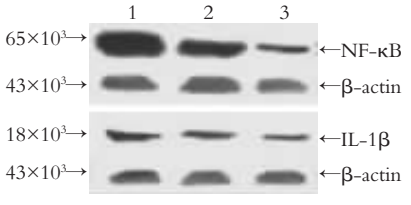
2.5 NF-κB、IL-1β 的蛋白质表达

MI 组和 MG 组 NF-κB 、IL-1β 的蛋白质表达量相对于 SH 组明显增加($P<0.01$),MG 组与 MI 组相比,其蛋白质表达量明显降低($P<0.01$),见表5 和图2。说明心梗后心脏的 NF-κB、IL-1β 的蛋白质表达量增加,而 MG-132 能抑制两者的表达。

表5 NF-κB、IL-1β 的蛋白质表达量($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	NF-κB/β-actin	IL-1β/β-actin
SH 组	0.45±0.04	0.27±0.03
MI 组	2.21±0.06[a]	0.74±0.04[a]
MG 组	1.38±0.07[ab]	0.46±0.03[ab]

a: $P<0.01$,与 SH 组比较;b: $P<0.01$,与 MI 组比较



1: MI 组; 2: MG 组; 3:SH 组

图2 大鼠心肌 NF-κB、IL-1β 的蛋白表达

3 讨论

心梗后心衰发生率和死亡率均较高,因而成为当今研究的难点和热点。本研究通过结扎冠状动脉左前降支复制出心梗模型,其心衰发生率及心衰发生后病死率分别达62.5%和40%。心梗后心衰的发生机制主要与心肌结构重塑有关,其心肌结构重塑主要表现为非梗死区心肌肥厚,梗死区室壁变薄、心腔扩张。本实验 MI 组动物的左室质量、左室后壁厚度、左室舒张末直径增加,左室前壁变薄,说明心梗大鼠发生了心肌结构重塑。

文献[1,7]报道,心梗后心肌结构重塑与炎性细胞因子表达增多密切相关,Ono 等[7]的研究表明:大鼠心梗后 20 周心肌 IL-1β、TNF-α 表达仍明显增加。Shioi 等[8]发现左室肥厚时,心肌 IL-1β mRNA 表达量较正常增加 3.9 倍,且左室心肌 IL-1β mRNA 表达量与左室质量指数呈正相关。而炎性细胞因子的转录主要由 NF-κB 调节,因此 NF- κB 在心肌结构重塑的过程中发挥重要作用。Frantz 等[9]发现大鼠心梗 10 周后心肌细胞中 NF-κB 持续表达增加。NF-κB 通常情况下以 p65/p50 组成二聚体的形式与其抑制因子 I-κB 结合成无活性三聚体存在于细胞质中。当细胞在缺血、缺氧等细胞外刺激下,泛素蛋白酶体系统活性增加,导致 I-κB 降解,NF-κB 与 I-κB 解离,变为具有活性的 p65 进入核内,从而导致炎性细胞因子如 IL-1β、TNF-α 表达增加。本研究 MI 组和 MG 组的 IL-1β 增加,也再次证实了心肌结构重塑过程中存在促炎细胞因子表达增多。本研究显示 MI 组大鼠的 NF-κB p65 的表达在心梗后 4 周就已有增加,亦提示了 NF-κB 的激活与心肌结构重塑相关。

许多研究表明,泛素-蛋白酶体抑制剂能抑制 NF-κB 的激活,降低炎性细胞因子水平[10]。Meiners 等[5]给自发性高血压大鼠腹腔内注射小剂量 MG-132,12 周后 IL-1β 表达降低,心肌成纤维细胞 MMPs 下调,胶原纤维沉积显著减少。戴翠莲等[2,3]的研究发现,MG-132 能降低 NF-κB 的表达,减轻大鼠心肌缺血再灌注的损伤。但是,蛋白酶体抑制剂能否改善心梗后心肌结构重塑尚少见报道。为此,本实验观察了 MG-132 对大鼠心梗后心肌结构重塑的干预作用。结果显示:左室后壁增厚、左室前壁梗死区变薄、左室扩张、左室质量指数增加等指标与 MI 组比较均得到了改善, NF-κB 和 IL-1β 的 mRNA 和蛋白表达量均显著减少,说明 MG-132 对梗死后心肌结构重塑有一定程度的改善作用,其机制可能与抑制 NF-κB 激活,下调炎性细胞因

子如 IL-1β 等的表达有关。

虽然 MG 组的心衰发生率和死亡率均低于 MI 组,但没有统计学意义,除了跟各组的例数较少有关外,也可能跟以下几个因素有关:①MG-132 对心梗后心肌结构重塑的干预作用可能较弱,不足以阻止心衰的发生、发展,需要以 ACEI 类药物为对照进一步研究。②介导炎症因子表达的信号通路成复杂的网络状,如果仅针对其中一条通路如 NF-κB 的抑制,可能难以达到降低心衰发生率的目的。如果联用其他通路抑制剂也许会收到较好的效果。③心梗后引起心肌结构重塑的机制很多,如交感神经系统、肾素-血管紧张素系统激活等。因此,要降低心衰的发生率和死亡率可能需要联用其他药物。

总之,本研究表明蛋白酶体抑制剂 MG-132 能一定程度地改善心梗后心肌结构重塑。其机制可能与抑制 NF-κB 激活,下调炎性细胞因子如 IL-1β 表达有关。

参考文献:

[1] Nian M, Lee P, Khaper N, *et al*. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling[J]. Circ Res, 2004(12), 94(12): 1543 – 1553.

[2] 戴翠莲, 罗开良. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(4): 528 – 531.

[3] 戴翠莲,罗开良. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 下调炎症因子表达抑制大鼠心肌再灌注损伤[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 129 – 133.

[4] 刘元生,陈运贞. 慢性心肌梗塞大鼠实验模型[J]. 重庆医科大学学报,2002,27(2): 153 – 155.

[5] Meiners S, Hocher B, Weller A, *et al*. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome[J]. Hypertension, 2004, 44(4): 471 – 477.

[6] Delyani J A, Robinson E L, Rudolph A E. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001,281(2): H647 – H654.

[7] Ono K, Matsumori A, Shioi T, *et al*. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling[J]. Circulation, 1998, 98(2): 149 – 156.

[8] Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, *et al*. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload[J]. Circ Res, 1997, 81(5): 664 – 671.

[9] Frantz S, Fraccarllo D, Wagner H, *et al*. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure[J]. Cardiovasc Res, 2003,57(3): 749 – 756.

[10] Elliott P J, Zollner T M, Boehncke W H. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy[J]. J Mol Med, 2003, 81(4): 235 – 245.

(编辑　邓强庭)

《现代美容整形外科学》征订启事

由军内外著名美容整形外科专家、第三军医大学西南医院教授领衔主编、国内外数十名经验丰富的美容整形外科专家和学者编撰,系统阐述了以常见经典手术为主的各类美容整形外科手术的基本原则及操作技术等最新知识的专著《现代美容整形外科学》于 2006 年 4 月由人民军医出版社出版,全国发行。本书特点:① 70 余位美容整形专家鼎力奉献,中韩 13 位著名权威专家主编、审定。② 系统介绍了头颅、额颞、面颈、牙颌、五官、胸壁、乳房、四肢、会阴、生殖器等各部位的美容整形手术的适应证、禁忌证、术前准备、麻醉与体位、手术步骤、术中注意要点、术后注意事项、术后处理以及并发症等,并配有大量精细的局部解剖和手术操作示意图或照片。全面阐述了美容整形、显微外科、创伤美容、麻醉、皮肤色斑及体表肿瘤、皮肤软组织扩张、吸脂减肥、组织移植、生物材料、组织工程、瘢痕的预防和治疗的最新知识和冷冻、文刺、计算机、内镜、超声、光子、纳米、激光等技术在美容整形外科的应用。根据当今美容整形外科的发展特点,还特别加入了人体美学、心理学、康复医学以及医学美容法规及医疗纠纷的防范等内容。③ 全书共计 1 848 页,插图 1 160 余幅,其中彩色插图 80 余幅。正 16 开,80 g 双面铜版纸彩色印刷。豪华精装加封面套盒。定价:680 元/册。

本书作者在参阅国内外大量最新文献的基础上,较全面地反映了美容整形外科学的发展水平。《现代美容整形外科学》是一部系统、全面介绍美容整形外科技术的专著,是从事美容整形外科的工作人员案头必备参考书,也是各级各类美容整形医疗单位、医学院校师生、图书馆、资料室重点收藏图书。

地　址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部　　**邮　编**: 400038

联系人:王　红　　**电　话**: (023)68752782, 68752189-84